

Title: **JP60248625A2: MONOCLONAL ANTIBODY FOR
COUNTERACTING PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ITS
PREPARATION AND USE**

Country: **JP Japan**
Kind: **A**

Inventor(s): **FUKUDA TAMOTSU
SHIGETA SHIRO
OKUYA HIROAKI
KUROIWA YASUYUKI
SUDO TADASHI**

[View
Image](#)

[1 page](#)

Applicant/Assignee: **mitsui toatsu chem inc**



News, Profiles, Stocks and More about this company

Issued/Filed Dates: **Dec. 9, 1985 / May 25, 1984**

Application Number: **JP1984000104810**

IPC Class: **A61K 39/395; A61K 39/104; C07K 15/04; C12P 21/00;
G01N 33/569; G01N 33/577; C12N 15/00; C12P 21/00;**

Priority Number(s): **May 25, 1984 JP1984000104810**

Abstract: **Purpose:** The titled antibody consisting essentially of a globulin selected from the group comprising IgM globulin and IgG globulin.



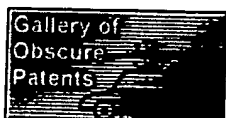
Constitution: A human B lymphocyte having antigen-forming ability on common antigen PSC-A of Pseudomonas aeruginosa (molecular weight: 15,000; protein content: 24W55wt%, saccharide content: 3.0W5.0wt%, hexamine content: ≤1.0wt%; property: light yellow powder; solubility: soluble in water, solution of salt, etc., slightly soluble in methanol, etc.; color reaction: positive in Lowry- Folin reaction, etc., negative in Erson-Morgan reaction, etc.; isoelectric point: PI=3.8W4.3) is infected with Eb virus, varied into a multiplication type capable of carrying out subculture, a clone that produces durably an antibody showing specificity to the PSC-A is selected, and a monoclonal antibody produced by it is collected. The antibody is useful as a reagent for diagnosing rapidly infectious diseases of Pseudomonas aeruginosa or as a preventive or remedy for injection with Pseudomonas aeruginosa.

COPYRIGHT: (C)1985,JPO&Japio

Family: **none**

Other Abstract Info: **none**

Foreign References: **No patents reference this one**



Nominate this
for the Gallery...

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-248625

⑤ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和60年(1985)12月9日
A 61 K 39/395		7043-4C	
		7043-4C	
C 07 K 15/04		6464-4H	
C 12 P 21/00		7235-4B	
G 01 N 33/569		7906-2G	
		7906-2G	
// C 12 N 15/00		7115-4B	
(C 12 P 21/00		7235-4B	
C 12 R 1:91)		6760-4B	審査請求 未請求 発明の数 4 (全22頁)

⑭ 発明の名称 抗緑膿菌モノクローナル抗体、その製法ならびに用途

⑯ 特 願 昭59-104810

⑰ 出 願 昭59(1984)5月25日

⑱ 発 明 者 福 田 保 茂原市東郷2142番地
 ⑱ 発 明 者 茂 田 士 郎 福島市大森字久保内147-28番地
 ⑱ 発 明 者 奥 谷 弘 明 茂原市東郷2142番地
 ⑱ 発 明 者 黒 岩 保 幸 茂原市東郷2142番地
 ⑱ 発 明 者 須 藤 忠 茂原市東郷2141番地
 ⑲ 出 願 人 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号

明 細 書

1. 発明の名称

抗緑膿菌モノクローナル抗体、その製法ならび
に用途

2. 特許請求の範囲

1. 下記の理化学的性質を有する緑膿菌共通抗原
である

PSC-A に対し特異的な親和性を示すモノク
ローナル抗体。

該 PSC-A の理化学的性質：

(1) 分子量

15,000

(2) 構成成分

蛋白質含量%：24～55

糖含量%：3.0～5.0

ヘキサミン含量%：1.0 以下

脂質含量%：7.0～10.0

(3) 性状、溶解性

淡黄色粉末であり、水、生理食塩液および

リン酸緩衝液に可溶、水に対する溶解度は
1mg/ml 以上である。メタノール、エーテ
ル、ヘキサンおよび⁷フロロホルムにはほと
んど溶けない。

(4) 呈色反応

ローリー・フォリン反応、ニンヒドリン反
応、フェノール硫酸反応、およびアンスロ
ン硫酸反応は陽性。エルソンモルガン反応
は陰性。

(5) 等電点

PI = 3.8～4.2 (等電点電気泳動法)

(6) 安定性

中性の水溶液中で、室温において24時間
以上安定である。

(7) 紫外外部吸収スペクトラム

272nm 附近に極大吸収を示す。

(8) 酵素活性

カゼインおよびコラーゲンに対する分解活
性を示さない。

(9) 特性

- i) マウス結合織由来培養細胞株のL細胞に対して本物質 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、また正常マウス脾由来培養白血球細胞に対して本物質 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ でそれぞれ24時間培養するとき直接細胞障害作用を示さない。
- ii) 生理食塩液に溶解した本物質またはフロイントの不完全アジュバントあるいは完全アジュバントに懸濁した本物質は、いずれもマウスに免疫するとマウス血清中に緑膿菌と反応する液性抗体が出現する。
- iii) 本物質に対して特異的な親和性を有する、マウスモノクローナル抗体(本文に詳述するモノクローナル抗体C-A^B)は公知の緑膿菌共通抗体O E Pおよび緑膿菌内毒素(リボ多糖体)と反応しない。
2. I γ Mグロブリン又はI γ Gグロブリンからなる群から選ばれたグロブリンから主としてなる特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

3. I γ Mグロブリンから主としてなる特許請求の範囲第2項記載のモノクローナル抗体。
4. I γ Gグロブリンから主としてなる特許請求の範囲第2項記載のモノクローナル抗体。
5. 特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体を少なくとも1種含む緑膿菌感染症診断用の試薬。
6. 特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体を少なくとも1種含む緑膿菌感染症に対する予防治療剤。
7. 特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体の少なくとも1種と抗緑膿菌活性を有する薬剤との複合体からなる緑膿菌感染症に対する予防治療剤。
8. モノクローナル抗体がI γ Mグロブリン又はI γ Gグロブリンからなる群から選ばれたグロブリンから主としてなる特許請求の範囲第5項記載の試薬又は第6項^{又は}~~または~~第7項記載の予防治療剤。
9. モノクローナル抗体がI γ Mグロブリンから

- 主としてなる特許請求の範囲第5項記載の試薬又は第6項^{または}~~または~~第7項記載の予防治療剤。
10. モノクローナル抗体がI γ Gグロブリンから主としてなる特許請求の範囲第5項記載の試薬又は第6項^{または}~~または~~第7項記載の予防治療剤。
11. 緑膿菌共通抗原P S C-Aに対する抗体産生能を持つ細胞とミエローマ細胞との間に細胞融合によりハイブリドーマを形成させ、該ハイブリドーマをクローン化し最終的に該P S C-Aに対して特異性を示す抗体を産生するハイブリドーマクローンを選択しそれが産生するモノクローナル抗体を取得することからなる特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体の製造法。
12. 緑膿菌共通抗原P S C-Aに対する抗体産生能を持つ細胞を該P S C-Aで免疫して動物の脾細胞リンパ節および末梢白血球からなる群から選択して用いることからなる特許請求の範囲第11項記載のモノクローナル抗体の製造法。
13. 緑膿菌共通抗原P S C-Aに対する抗体産生能を持つ細胞がヒトBリンパ系細胞である特許請求の範囲第11項記載のモノクローナル抗体の製造法。
14. 緑膿菌共通抗原P S C-Aに対する抗体産生能を持つ細胞およびミエローマ細胞が共にマウス由来である。特許請求の範囲第11項記載のモノクローナル抗体製造法。
15. 緑膿菌共通抗原P S C-Aに対する抗体産生能を持つヒトBリンパ系細胞にEBウイルスを感染させて継代培養可能な増殖型に変異させ、該P S C-Aに対して特異性を示す抗体を持続産生するクローンを選択し、それが産生するモノクローナル抗体を取得することからなる特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体の製造法。
3. 発明の詳細な説明
(発明の目的)
- 本発明は、緑膿菌共通抗原P S C-Aに対して特異的な親和性を示すモノクローナル抗体とその

製造法およびその用途、すなわち具体的には緑膿菌感染診断薬および緑膿菌感染予防治療剤に関する。

緑膿菌（以下、シュドモナス・アエルギノースということがある）は、今日日和見感染の病原菌の代表菌であり、その感染症は種々の基礎疾患の存在下での発病が多くいったん発病すると容易に全身性に進展し重篤化することが指摘されている。また、緑膿菌感染症の基礎疾患で頻度の高いものとして、びまん性汎細気管支炎・気管支拡張症・慢性肺気腫等の呼吸器疾患の患者、癌患者、熱傷患者あるいは免疫抑制療法下の患者などが知られている。

こうした中で、抗緑膿菌活性を有する抗生物質などの薬剤による化学療法は従来に比べれば薬剤の種類も増し抗菌力も向上したためそれなりに治療成果が上りつつあるが、緑膿菌感染症の多くが上述の基礎疾患などに基づく高度の免疫不全状態のもとで発病しているだけに強力かつ適正な薬剤による化学療法のみでは効果を望めぬ症例がしばし

ば出現するという問題点も無視出来ないものになっている。このように緑膿菌感染症が難治性であるため、薬剤による化学療法以外に生体側すなわち宿主側の緑膿菌処理能力を増強させるという観点から主として宿主の免疫学的防御機能を高める研究の試みがいくつか行われてきている。

その1つの代表例は、緑膿菌由来の感染防御抗原を用いた感染防御すなわちワクチン療法であるが、これまでに比較的高次段階まで研究開発が進んでいるものとして、13種以上の緑膿菌の血清型別特異抗原を混合した多価ワクチン（Lancet II: 977, 1979）や本間らにより分離された緑膿菌の各血清型菌に共通する感染防御抗原、すなわち緑膿菌共通抗原OEP（Jpn. J. Exp. Med.; 47, 393-402, 1977）、さらにはOEPに緑膿菌由来のプロテアーゼトキシノイド、エラスターゼトキシノイドあるいはエクソトキシントキシノイドを加えた3種あるいは4種混合ワクチン（Jpn. J. Exp. Med., 48, 41-51, 1978, Proc. 14th Meeting of Jpn Pseudomonas aerugi-

nosa Society, P. 14）によるワクチン療法が挙げられる。

しかしながら、これらのワクチンは多成分系のため製造が複雑であったり、肝腎の感染防御効果や副作用の問題などもあり未だ実用化される段階に至っていない。また、ヒト血清免疫グロブリンの受働免疫による免疫グロブリン療法も静注用製剤の開発に伴って試みられて来ているが効果の点で疑問視する向きも多い。

現存の免疫グロブリン製剤は多数の健康人から集めたプール血清から分離したIgGを主とする製剤であるため、一般に緑膿菌に対する抗体価が低いことが知られており、効果発現に要する機序については多彩な緑膿菌抗原に対する抗体の種類や治療抗体のレベル等を含めて明確でなく、これが一定の効果について期待出来ない理由になっている。

さらに、緑膿菌に対する抗体価が特に高い血清から作製した高度免疫ヒト血清免疫グロブリン（以下、高度免疫グロブリン）を、免疫グロブリン療

法に用いる試みも行なわれてきているが原料血清の資源量に限りがあるため、実用化にはまだ相当の道のりがあるといわれている。

1例として国外では、緑膿菌の多価ワクチンを健康人に投与して得た高度免疫グロブリンを敗血症の危険性のある熱傷患者に投与して有効であったことが報告されている（Lancet [8207] 1263-1265, 1980）が、これとて未だ研究の域を出るものではなく、また多価ワクチンが実用化されていない今日上述の高度免疫グロブリンの実用化のための量的な確保手段すら未解決と言える。

一方、前述のような難治性の緑膿菌感染症の治療においては、同菌による感染を迅速かつ適確に診断し早期に治療にもちこむことが重要とされている。しかしながら、従来の臨床検査における細菌の同定法は数多くの試薬に対する反応からなる検査系で行なわれており、近年簡便にして小型のキットが上市されたとは言え未だかなりの手数を要するので、迅速かつ適確な診断という点において必ずしも最善なものとは言えない。

かかる折、本発明者らは緑膿菌に対する効果的な感染防御ワクチンの開発を目標として研究中に、緑膿菌のすべての血清型菌に共通に反応するマウスモノクローナル抗体(以下C-A bという)の作成に成功し、該C-A bを固定化したアフィニティカラムを用いてC-A bに対応する抗原成分を緑膿菌の各血清型菌から同一物質として分離・精製することに成功した。また得られた該抗原成分がその理化学的性質あるいは特性からリボ糖蛋白からなる従来知られていない全く新規な緑膿菌共通抗原であることとあわせて動物感染実験において各種血清型の緑膿菌感染に対して強い防御活性すなわちワクチン効果を有することを見出しこの抗原成分をP S C-Aと命名し特許出願中である。

さらにこの緑膿菌共通抗原P S C-Aの感染防御能を研究する過程で、該P S C-Aで免疫した動物の脾細胞とミエローマ細胞との間に細胞融合によって形成される種々のハイブリドーマが産生するP S C-Aに特異的な親和性を示すモノク

ローナル抗体が、緑膿菌のすべての血清型菌と共通に反応しかつ動物感染実験で緑膿菌の各種血清型菌の感染に対してすぐれた予防治療効果を示すこと、また同時に該モノクローナル抗体が臨床検査における緑膿菌感染症の迅速診断のための試薬に好適であることを見出し、さらに後述する諸種の知見を重ねて本発明を完成するに至ったものである。

以下、本発明の緑膿菌共通抗原P S C-Aに対して特異的な親和性を示すモノクローナル抗体を単にP S C-Aに特異なモノクローナル抗体、抗P S C-Aモノクローナル抗体、本発明のモノクローナル抗体と称することが多い。

また、緑膿菌共通抗原P S C-Aを単にP S C-Aと称することが多い。

(発明の構成)

本発明は、前述した緑膿菌感染症の予防・治療および診断上の問題点に対して1つの解決策を提供することを目的とし、新たに緑膿菌感染の防御抗原であることを見出した緑膿菌共通抗原P S

C-Aに対するモノクローナル抗体をつくりそれを使用することによって目的を達成しようとするものである。

すなわち、本発明は緑膿菌共通抗原P S C-Aに対して特異的な親和性を示すモノクローナル抗体とその製造法およびその用途さらに具体的には緑膿菌感染診断用薬および緑膿菌感染予防治療剤に関するものである。

従って本発明による緑膿菌共通抗原P S C-Aに対するモノクローナル抗体とはP S C-Aに対する抗体を産生する細胞とミエローマ細胞との間に形成されるハイブリドーマあるいはP S C-Aに対する抗体産生細胞にE Bウイルスを感染させて増殖型に変異させた細胞(以下E B V形質転換細胞ということがある)にそれぞれ産出させたP S C-Aに特異的な親和性を示しかつ緑膿菌のすべての血清型菌体に共通に反応するものである。

また、本発明のP S C-Aに対するモノクローナル抗体は、本発明に従って、P S C-Aに対する抗体を産生する細胞と抗体産生ハイブリドーマ

の作成に適した細胞融合用パートナー細胞例えばミエローマ細胞との間で細胞融合により形成させたハイブリドーマあるいはP S C-Aに対する抗体産生細胞にE Bウイルスを感染させて増殖型に変異させた細胞すなわちE B V形質転換細胞をそれぞれ増殖させて、それらの増殖細胞が産生するP S C-Aに特異的なモノクローナル抗体を取得することによって製造される。

さらに本発明は、本発明によるP S C-Aに特異的なモノクローナル抗体を少なくとも1種含む緑膿菌感染症に対する診断用の試薬に関するものである。

さらに本発明は、本発明によるP S C-Aに特異的なモノクローナル抗体を少なくとも1種含む緑膿菌感染症に対する予防治療剤あるいは、本発明によるP S C-Aに特異的なモノクローナル抗体の少なくとも1種と抗緑膿菌活性を有する薬剤との複合体からなる緑膿菌感染症に対する予防治療剤に関するものである。

かくして本発明のモノクローナル抗体は、グロ

第 1 表

緑膿菌研究 会分類	菌 株 名
A	シェードモナス・ アエルギノサ IID1001, chiba N-3117
B	" IID1893, IID1887
C	" IID1037
D	" IID1004
E	" IID1130, F4858-52, N-10, PA103
F	" IID1006, chiba 1495
G	" IID1020, ATCC10145, chiba N-3184, P-28
H	" IID1009
I	" IID1010, chiba N-3522
J	" IID1011
K	" IID1012
L	" IID1014
M	" IID5018

＊： 第1表に例示したA～M群に属する緑膿菌の菌株のうち、
IID株は東京大発医医学研究所に保存されており第三者
に自由に分譲される。

ブリンクラスがI ϕ GおよびI ϕ Mのいずれかであるが、いずれの場合も緑膿菌のすべての血清型菌体と共通に反応する性質を有し、また本発明のモノクローナル抗体の少なくとも1種のみでも緑膿菌の各種血清型菌の感染に対してすぐれた予防治療効果を与えるという前述した緑膿菌感染症の予防・治療上の問題に対して1つの合理的な解決策を与えている。

さらに、本発明のモノクローナル抗体は、該抗体の少なくとも1種のみでもすべての緑膿菌による感染に対して迅速かつ適確な同定が可能な診断用試薬に随意に組み込めるという点で画期的なものである。

つぎに本発明について具体的に説明する。

本発明という緑膿菌は、血清学的分類法に従って例示すると具体的な菌株との関係は第1表の通りである。

緑膿菌の分類同定に関しては議論の多いところであるが、本発明では緑膿菌の分類を緑膿菌研究会主催の型別検討委員会の決定(1975年)による

血清学的分類に従うものとし、この分類に基づくA～M群に属する菌株はすべて本発明に述べる緑膿菌の血清型菌の対象になる。なお、本発明では緑膿菌の分類法として型別検討委員会の決定による血清学的分類を現時点での最善のものと判断したが、将来において新分類基準が採択されることを考慮した場合本発明の緑膿菌とは、本発明に述べる新規の緑膿菌共通抗原PSC-Aを菌体に保持する細菌菌株すべてがその~~包括~~対象になると言える。

また本発明に述べる新規の緑膿菌共通抗原PSC-Aは、上述の第1表に例示した緑膿菌のすべての血清型菌が共通に菌体に保持しているものであり、したがって該PSC-Aは例えば本発明者らが作成に成功した緑膿菌のすべての血清型菌に共通に反応しかつPSC-Aに特異的な親和性を示すマウスモノクローナル抗体C-Abを固定化したアフィニティカラムを用いれば、すべての緑膿菌菌体の破砕抽出による無細胞抽出液から同一物質として簡便かつ高収率に分離することが可能

である。上述のPSC-Aに特異的な親和性を示すマウスモノクローナル抗体C-Abの作成とその性質ならびにPSC-Aの調製法とその性質を実施例をもって具体的に説明すると実施例1に例示する通りである。

実施例1 マウスモノクローナル抗体 C-Ab の 作製とその性質ならびに PSC-A の調 製とその性質

(1) マウスモノクローナル抗体 C-Ab の作製

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作成は Köhler, Milstein らの公知の方法に準じて行なつた。すなわち、シュードモナス・アエルギノース 11D 1130 (E 型) の 0.3 % ホルマリン処理菌体をフロイントの不完全アジュバントでエマルジョンとし、1 週おきに計 5 回 BALB/c 雌雄マウスの腹腔内に投与して免疫した後、最終免疫の 4 日後のマウスの脾細胞 5×10^8 個と NS-1 マウスミエローマ細胞 5×10^7 個との 50 % ポリエチレングリコール存在下における細胞融合によつて得られたハイブリドーマを 96 ウェル平底プレートに分注し HAT 培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン含有) を添加した 10 % 牛胎児血清加ダルベッコ MEM 培地で 5 % CO₂ 存在下 37℃ で培養した。

ハイブリドーマの増殖を認めたウェルについて

培養上清の抗緑膿菌モノクローナル抗体の存在の有無を酵素免疫測定法であるドットイムノバインディングアッセイ法 (Analytical Biochemistry 119, 142-147, 1982, 以下 DIBA 法という) で測定した。DIBA 法は 96 穴ウェルリ底マルチプレート (ファルコン) を用い、1 ドット当り 0.4 μ g の 0.3 % ホルマリン処理緑膿菌の全菌体を抗原として固定したメンブランフィルター (3.1 mm 角) と上記の培養上清 100 μ l を室温で 30 分、ついでパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス、イムノグロブリン抗体 (DAKO 社製) と 30 分反応後クロルナフトールを基質として発色させ抗原を固定したメンブランフィルター上に肉眼観察で発色を認めたものを抗体産生が陽性と判定した。培養上清にモノクローナル抗体産生が認められたハイブリドーマはさらに限界希釈法でクローニングを行ない、モノクローンになつたハイブリドーマはフラスコで増殖させた後、免疫抑制剤プリスタン (アルドリッチ社) で前処理 BALB/c マウスの腹腔内に移植し得られたマウス腹水からブ

ロテイン A-セファロース (ファルマシア社) のアフィニティカラムを用いてモノクローナル抗体を精製した。かくして得られた種々の抗緑膿菌モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの中から、本発明者らは緑膿菌のすべての血清型菌と共通に反応するモノクローナル抗体 C-Ab を産生する C-Ab 産生ハイブリドーマを見出した。

(2) マウスモノクローナル抗体 C-Ab の性質

この C-Ab のグロブリンクラスは IgG であり、また DIBA 法による C-Ab の緑膿菌の血清型菌に対する反応性を例示すると第 2 表の通りとなり、C-Ab はいずれの血清型菌ともほぼ等しい親和性を示したが、緑膿菌以外の細菌とは反応しなかつた。また、C-Ab は緑膿菌 B 型菌由来の内毒素 (リボ多糖体、シュードモナス・アエルギノース N-10 株よりモリソン法により自家調製) および OEP (シュードモナス・アエルギノース N-10 株より本間らの方法で自家調製) とも反応しなかつた。

なお、プロテイン A-セファロースのアフィニ

ティカラムによる C-Ab 精製品の後述する PSC-A を抗原とする抗体価は DIBA 法で $2.56 \times 10^6 / 1 \mu\text{g/ml}$ と極めて高いものであつた。したがつて、このことは本発明に述べる PSC-A が緑膿菌の内毒素や OEP とは免疫学的に異なる性質をもつことを示している。

第 2 表

菌 株 ※1	血清型 ※2	DIBA法によるO-Abの 抗体価 ※3
シュードモナス・アエルギノーサ IID 1001	A (1)	$5^3 \times 10^2$
Chiba N-3117	A (1)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1002	B (2)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1007	B (7)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1013	B (13)	$5^4 \times 10^2$
" IID 5004	B (16)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1037	C (3)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1004	D (4)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1130	E (5)	$5^4 \times 10^2$
" F4858-52	E (5)	$5^4 \times 10^2$
" PA 103	E (5)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1006	F (6)	$5^4 \times 10^2$
" Chiba 1495	F (6)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1020	G (8)	$5^4 \times 10^2$
" ATCC 10145	G (8)	$5^4 \times 10^2$
" P-28	G (8)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1009	H (9)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1010	I (10)	$5^4 \times 10^2$
" Chiba N-3522	I (10)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1011	J (11)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1012	K (12)	$5^4 \times 10^2$
" IID 1014	L (14)	$5^4 \times 10^2$
" IID 5018	M (15)	$5^4 \times 10^2$
シュードモナス・セバシヤ F4402-52		< 10
シュードモナス・マルトフィリヤ F6257-49		< 10
シュードモナス・ブチダ IPO 12996		< 10
エスセリビア・ユリ K12		< 10
プロチウス・モルガニ F5120-52		< 10
セラシア・マーセスセンス IID 620		< 10
クレブジエラ・ニューモニアエ ATCC 10031		< 10
サルモネラ・エンテリチティディス KB21		< 10
エンテロバクター・クロアカエ D-49		< 10
シガラ・ダイセンチリアエ NO		< 10
スタフィロコッカス・アウレウス 209P		< 10
バチルス・ズブチリス ATCC 6633		< 10

※1: DIBA法に供した菌株はすべて0.3%ホルマリン処理菌体を抗原として等量メンブランフィルターにドットした。

※2: 緑膿菌研究会分類, ()内は本問からの分類。

※3: O-AbはO-Ab産生ハイブリドーマをBALB/Cマウスの腹腔内に移植し、得られた腹水を遠心分離 (3000×g) してその上清を用いた。各菌株に対するO-Abの抗体価はDIBA法により各菌株抗原を固定したメンブランフィルター上に呈色を認めるO-Ab (感水上昇) の最大希釈倍数で表わした。

(3) PSC-A の調製

グルタミン酸ナトリウム	20g
グリセリン	5g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.1g
KH ₂ PO ₄	0.55g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	5.6g
Ca(NO ₃) ₂ ・4H ₂ O	17.26g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	50μg
(水を加えて1ℓにし、pH 7.4にアンモニア水で調整する。)	

シュードモナス・アエルギノーサ ATCC 10145 (O型) を普通寒天培地で37℃1夜培養し、増殖した菌体を生理食塩液に懸濁しその0.5mlを上記組成の本問からの合成培地150mlを含む坂口フラスコに接種し37℃で16時間振とう培養した。

培養後坂口フラスコ1本当たり1.2mlのホルマリンを加えて充分混合し室温に1時間放置した。ついで培養液を遠心分離 (12000×g 30分間) して菌体を集め、さらに生理食塩液と蒸留水で洗

浄処理と遠心分離を繰返し湿菌体295gを得た。

この湿菌体を2% Triton X 100および10mMEDTAを含む20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 1.2ℓに懸濁した後氷冷下 DYNOMILL (ビーズ0.1mmφ) を用い流速60ml/分で3分間破砕した。この菌体破砕懸濁液は静置後上澄液をデカンテーションにより集め、残渣に上記緩衝液2.8ℓを加えてよく攪拌して静置し再びその上澄液をデカンテーションにより集めた。デカンテーションにより集めた上澄液はブルーシ遠心分離処理 (39000×g 30分間) して遠心上清約4ℓを得た。

この遠心上清をアフィニティ10 (バイオラド社製) を担体として固定化した上述のモノクローナル抗体O-Abを詰めたアフィニティカラム (サイズ30×100mm、アフィニティ10 1mlに対してO-Ab 15μg結合) に付し、0.5% Triton X 100を含む20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 500ml、20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 500mlで順次カラムを洗浄し

た後最終的に5.0 mM グリシン-HCl緩衝生理食塩液 (pH 3.0) 300 mlで溶出させた。得られた溶出液は1N炭酸水素ナトリウム水溶液で中和後、蒸留水に対して4℃で24時間透析を行ない、透析内液を凍結乾燥して本発明に述べるPSC-A原末を25%得た。

(4) PSC-Aの性質

上記(3)において精製して得られたPSC-Aの理化学的性質を調べた結果を示す。なお他の緑膿菌の血清型菌より得られたPSC-Aも同様の性質を示す。

PSC-Aの理化学的性質：

⑴ 分子量

15000 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による)

但し、下記条件のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) においてクマシブリリアントブルー R 250 で染色される単一バンドを示す。

PAGE 条件		結果
pH 9.5	7% ゲル	Rf = 0.86

ル TLC により石油エーテル：エーテル：酢酸 (80：20：1) で展開し50%硫酸加熱反応により発色させるとき呈色は原点に認める。

⑶ 性状、溶解性

淡黄色粉末であり、水、生理食塩液およびリン緩衝液に可溶。水に対する溶解度は1%以上である。メタノール、エーテル、ヘキサンおよびクロロホルムにはほとんど溶けない。

⑷ 呈色反応

ローリー・フォリン反応、ニンヒドリン反応、フェノール硫酸反応およびアンスロン硫酸反応は陽性。エルソンモルガン反応は陰性。

⑸ 等電点

PI = 3.8 ~ 4.2 (等電点電気泳動法)

⑹ 安定性

中性の水溶液中で、室温において24時間以上安定である。

⑺ 紫外吸収スペクトラム

図面に示したとおり、272 nm 附近に極大

pH 9.5 10% ゲル Rf = 0.80

pH 9.5 12% ゲル Rf = 0.78

⑵ 構成成分

蛋白質含量(%)：27.0 (ローリー変法、牛血清アルブミン標準)

24.0 (プロテインバイディングアッセイ法、牛血清アルブミン標準)

55.0 (加水分解によるニンヒドリン比色法、牛血清アルブミン標準)

糖含量(%)：3.0 ~ 5.0 (フェノール硫酸法、グルコース標準)

ヘキサミン含量(%)：1.0 以下 (ロンドル・モルガン法、グルコース標準)

脂質含量(%)：7.0 ~ 10.0 (ブリフ・ダイエルの変法)

但し、本物質のクロロホルム・メタノール抽出物 (ブリフ・ダイエルの変法) をシリカゲ

吸収を示す。

⑻ 酵素活性

カゼインおよびコラーゲンに対する分解活性を示さない。

⑼ 特性

i) マウス結合織由来培養細胞株のL細胞に対して本物質10 μg/mlで、また正常マウス脾由来培養白血球細胞に対して本物質2 μg/mlでそれぞれ24時間培養するとき直接細胞障害作用を示さない。

ii) 生理食塩液に溶解した本物質またはフロイントの不完全アジュバントあるいは完全アジュバントに懸濁した本物質はいずれもマウスに免疫するとマウス血清中に緑膿菌と反応する液性抗体が出現する。

iii) 本物質に対して特異的な親和性を有するマウスモノクローナル抗体 (本発明のモノクローナル抗体 C-Ab) は公知の緑膿菌共通抗原 OBP および緑膿菌内毒素 (リポ多糖体) と反応しない。

つぎに本発明のモノクローナル抗体の基本的な製造方法について述べる。

本発明によるPSC-Aに特異なモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合法およびBBウイルスによる形質転換法によつてそれぞれ製造することが可能である。

細胞融合法によるモノクローナル抗体の作成は用いる抗原が新規なPSC-Aである以外、Mills、Köhlerらによつて明らかにされ、その後種々改良された公知の方法を利用することが出来る。例えばハイブリドーマの作成およびモノクローナル抗体の製造についてはJ. Immunol. Methods 39, 285-308、1980に示された報文が最も一般的な解説資料として利用することが出来る。

細胞融合法による本発明のモノクローナル抗体の作成例はすでに前述の実施例1に示される如くであるが、さらに具体的に感様を示せばつぎの通りとなる。

まず細胞融合に用いる抗体産生細胞の調製法は緑膿菌の各種血清型菌のホルマリン処理による無

毒化菌体をそのまま抗原として用いることも可能であるが、効率的な方法として実施例1で得たPSC-Aを抗原として生理食塩液等に溶解するかまたは市販のフロイントの不完全アジュバントあるいは完全アジュバントに混じてエマルジョンにするかして動物たとえばBALB/Cマウスの腹腔内または皮下に投与して免疫する。なお、本発明におけるこのPSC-Aによる免疫操作は1つの抗原成分のみで緑膿菌の各種血清型菌に対して共通に反応する抗体産生を誘導するという意味で画期的なものである。PSC-Aを抗原として動物に免疫する場合、投与剤型にもよるが1回の免疫用量はおおむね1 μ g \sim 100 μ g/頭が適当である。

初回免疫後要すれば1 \sim 2週間程度の間隔で同じPSC-A抗原を投与して追加免疫を行なうが、追加免疫の回数はフロイントの不完全あるいは完全アジュバントでエマルジョンにして投与する場合1 \sim 2回で充分である。また、PSC-A生理食塩液等に溶解した水溶液として投与する場合も3 \sim 4回追加免疫すれば後述のPSC-Aに対する抗

体産生細胞を取得するのに充分な免疫状態に達する。最終免疫後3 \sim 4日経過してマウスの脾臓を摘出して抗体産生細胞を得ることが出来る。この場合、脾細胞以外にリンパ節や末梢血の白血球細胞も抗体産生細胞として用いることが可能である。

PSC-Aで免疫した動物から得られた抗体産生細胞は、予め培養しておいたHAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン含有培地)に感受性のマウス由来のミエローマ細胞たとえばP3-NS1/1-Ag4.1(略号NS-1)あるいはP3-X63-Ag8. U1(略号P3 U1)と1:1 \sim 10:1程度の比率で混合し、さらに適当な細胞融合用培地たとえば50%ポリエチレングリコールを含む市販のダルベッコMEM培地や40%ポリエチレングリコールと15%ジメチルスルホキサイドを含む市販のRPMI1640培地を加えて、公知の方法により両細胞を融合させてハイブリドーマを形成させ、ついで培地をハイブリドーマのみの増殖に適したHAT培地に代えハイブリドーマの培養物を得る。ハイブリドーマ培養物は市販の組織培養

用24ウエルあるいは96ウエルのプラスチックマルチプレート等に分注してHAT培地で1 \sim 2週間培養する。この際フィーダー細胞として正常マウス脾臓由来の白血球細胞を共存させるとハイブリドーマの増殖を早めることが出来る。かくしてハイブリドーマの明瞭な増殖が認められたウエルの培養上清を別のマルチプレート中で抗原として固定化したPSC-Aあるいは要すればホルマリン処理無毒化緑膿菌体(A \sim M型のいずれの菌株でもよい)と反応させる。反応後固定化した該抗原を適当な緩衝液で洗浄しついで市販の酵素標識抗体たとえばパーオキシダーゼ標識抗マウスグロブリン抗体を用いてエンザイムイムノアッセイ(以下、EIA)を行ない、目的とするPSC-Aに特異的な親和性を示しかつ緑膿菌体とも反応する抗体を産生しているハイブリドーマをスクリーニングする。この場合に用いるEIA法の術式としては実施例1に記載したように抗原をメンブランフィルターにドットして用い、酵素標識抗体による酵素反応の呈色割合を直ちに肉眼判定出来るド

ットイムノバイディングアッセイ法 (DIBA 法) が簡便にして経済的な手段として推奨される。

上述のスクリーニングによつて目的とする抗体産生を認めたハイブリドーマについては、さらに公知の限界希釈法によりクローニングを行ない、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを得る。これらの樹立されたハイブリドーマクローンは継代培養すれば本発明のモノクローナル抗体の製造にそのまま使用できるが、必要に応じて公知の方法による保存用処置を行ない、 -80°C でディープフリーザーや液体窒素の入った保存庫内に凍結保存することも可能である。

つぎに樹立されたハイブリドーマクローンをを用いて本発明のモノクローナル抗体を製造する場合は、10%牛胎児血清加 RPMI 1640 培地あるいはダルベッコ MEM 培地や近時市販の無血清培地でハイブリドーマクローンを大量培養するかあるいはハイブリドーマクローンをマウスの腹腔内に移植するかして増殖させることによつて本発明のモノクローナル抗体を製造することが出来る。特

に後者のマウス腹腔内へのハイブリドーマクローンの移植による製造法は高濃度の本発明のモノクローナル抗体を得る方法として推奨される。

すなわち、予め培養して得た細胞数 $10^6 \sim 10^7$ 個のハイブリドーマクローンを免疫抑制剤ブリストラン (アルドリッチ社製) で前処理しておいた BALB/c マウスの腹腔内へ接種する。ついで接種後 1~2 週間程度経過して貯留された腹水を採取するというものである。このようにして得られる培養液や腹水中の本発明のモノクローナル抗体は精製して用いるのが望ましく精製法としては免疫グロブリンの精製に採用される任意のものを適宜選択して用いることが出来る。たとえば硫酸ナトリウムや硫酸による塩析法、DEAE セルロース等によるイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法あるいは固定化プロテイン A 等によるアフィニティクロマトグラフィー等が適当であり、これらを適宜組み合わせることによつて高純度の本発明のモノクローナル抗体を得ることが出来る。

また、本発明のモノクローナル抗体のグロブリ

ンクラス IgG と IgM の同定はゲル濾過法と酵素標識抗体による BIA を併用することによつて可能である。本発明者らは本発明のモノクローナル抗体がマウス由来の場合、セファクリル S300 (ファルマシア製) を用いたゲル濾過法およびパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体とパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgM 抗体 (カップル製) を用いた BIA 法を併用し同定している。後述するヒト由来モノクローナル抗体の場合は、セファクリル S300 のゲル濾過法とパーオキシダーゼで標識したヤギ抗ヒト IgG 抗体と同ヤギ抗ヒト IgM 抗体 (カップル製) による BIA 法を併用することが出来る。

なお、本発明の細胞融合法においては、PSC-A に対する抗体産生能を持つ細胞として健常人の末梢血、患者手術時の摘出リンパ節 (たとえば扁桃腺) や分娩時の臍帯血から得られるヒト B リンパ系細胞を融合に用い、ヒト由来の本発明のモノクローナル抗体を製造することも適用可能である。

この場合、用いるヒト B リンパ系細胞は血清中

に PSC-A あるいは A~M 型のいずれかの緑膿菌菌体に対する抗体産生が認められる健常人あるいは患者由来のものが細胞融合による本発明のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの出現頻度が高いという点で有利である。すなわち、血清中に該抗体を産生する健常人および患者由来の末梢血、臍帯血あるいはリンパ節から得られる単細胞浮遊液を公知のファイコール・コンレイ比重遠心法等に付し単核細胞バンド部分を採取しこれを抗体産生ヒト B リンパ系細胞源として細胞融合に用いることが出来る。

このヒト B リンパ系細胞を用いた細胞融合によるハイブリドーマ作成には HAT 培地に感受性のヒト由来ミエローマ細胞あるいはリンパ芽球様細胞を細胞融合のパートナー細胞として用いるのが好適であるが、前述のマウスミエローマ細胞をパートナー細胞とすることも適用可能である。

また、該ヒト B リンパ系細胞は直ちに細胞融合に付してもよいが、あらかじめ試験管内で PSC-A と接触させて一定時間培養した後、細胞融合に

供する方が本発明のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの取得効率を一層高めることが出来るという点ですぐれている。このように細胞融合に先立つてヒトBリンパ系細胞をPSC-Aと接触させて培養することは、取得しようとする目的抗体に対応する抗原によるリンパ系細胞の*in vitro*感作を意味しており、本発明においてなしうる効果的な手段である。

該ヒトBリンパ系細胞の細胞融合条件ならびに形成されたハイブリドーマのスクリーニングさらにはクローニングに至る過程の基本的術式はハイブリドーマによる産生抗体検出にEIAによる酵素標識抗体として例えば市販のパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いる以外、前述のマウスハイブリドーマの場合に準拠して実施することが出来る。また、得られたハイブリドーマクローンによるヒト由来の本発明のモノクローナル抗体の製造は市販の牛胎児血清添加培地あるいは無血清培地でハイブリドーマクローンを適宜のスケールで培養することにより行なうこ

ることが出来る。

すなわち、前述の細胞融合の項で示したと同様に健康人の末梢血、手術時の患者のリンパ節あるいは分娩時の臍帯血から分離されるヒトBリンパ系細胞を培養に適した培地例えば20%牛胎児血清加RPMI1640培地で培養した後EBウイルスと混合し接触感染させる。

この場合、培養したヒトBリンパ系細胞に直接EBウイルスを接触感染させてもよいが、細胞融合の項に示したようにあらかじめPSC-Aを抗原として接触させて*in vitro*抗原感作を行なう方がPSC-Aに対して特異性を示す抗体産生細胞の出現率の増加が期待出来るという点ですぐれておりこの操作は本発明においてなし得る効果的な手段である。

また、用いるヒトBリンパ系細胞は血清中にPSC-Aあるいは緑膿菌菌体に対する抗体産生が認められる健康人あるいは患者由来のものが上述の*in vitro*抗原感作に類した意義があり好適である。

とが出来る。培養液からヒト由来の本発明のモノクローナル抗体の精製法も前述のマウス由来の場合となんらかわらない手法の組み合わせが適用可能である。

つぎに、本発明のうち、PSC-Aに対する抗体産生能を持つヒトBリンパ細胞にEBウイルス(Epstein-Barrウイルス)を接触・感染させて該Bリンパ系細胞を継代培養可能な増殖型に変異させヒト由来の本発明のモノクローナル抗体を持続産生するクローンを選択しそれが産生する抗体を取得することからなる製法、いわゆる、EBウイルス形質転換法による本発明のモノクローナル抗体の製法の実施の態様を述べる。

EBウイルス形質転換法によるヒトモノクローナル抗体の製造法の基本術式は、小野やKleinらのグループの報告(第4回日本免疫学会総会記録399頁、1974., *Nature* 267、52-54、1977)をはじめとして多くの報文が提出されて来ているので、本発明で用いる抗原が新規なPSC-Aであることを除けば公知の方法として利用す

前述のEBウイルスを接触感染させたヒトBリンパ系細胞は培養液を交換しつつ培養を継続しこの間にEBウイルスによつて変異し細胞増殖のみられたものを継代培養に移す。この継代培養液の上清につきPSC-Aに対する抗体の有無を細胞融合の項で述べたと同様にEIAで測定し該抗体濃度が明瞭に検出される培養物について後述するクローニングを行ない本発明のモノクローナル抗体を持続産生するクローンを取得する。

なお、EBウイルスは該ウイルスを持続産生して放出している細胞株たとえばマーモセツトリンパ球由来のB95-8細胞(*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 1973)を20%牛胎児血清加RPMI1640培地で培養し、該細胞の増殖ステージが静止期に近い状態の培養液上清を遠心分離してEBウイルス源として用いるのが好適である。また、EBウイルス感染価(50%トランスフォーメーション/*ml*; TD50/*ml*)は健康人の末梢リンパ球を用いたトランスフォーメーションアッセイ(*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70,

190, 1973)によつて測定することが出来る。

PSC-A に対する抗体産生細胞のクローニングは、公知の方法に従つて EB ウイルスによつて形質転換したヒト B リンパ系細胞集団を多数の細胞小集団に細分して培養し、該抗体の産生能の高い細胞集団を選び出す操作を反復することによつて行なうことが出来る。たとえば、形質転換により該抗体産生能が認められる細胞集団をマイクロプレート中の各ウェルに細胞数 $10^4 \sim 10^5$ 個/ウェル/0.1 ~ 0.2 ml の割合で分注して培養を繰り返すことにより行なうことが可能である。この操作によつて PSC-A に対する抗体以外の抗体産生細胞の混入率の低い細胞集団を選別することが出来、究極的に抗体価の高い本発明の目的抗体を得ることにつながる。

さらに効果的なクローニング法としてはロゼット形成による方法を行なうことが出来る。すなわち、PSC-A に対する抗体産生能の高い細胞集団の浮遊液に PSC-A 感作ヒツジ赤血球を加え、PSC-A に対する抗体産生細胞とヒツジ赤血球と

の結合体からなるロゼットを形成させる。

このロゼットを密度勾配遠心法により分離し、該ロゼットを常法の低浸透圧溶液か塩化アンモニウム溶液中に浮遊させヒツジ赤血球を手早く溶血させた後培養液を添加し遠心分離して抗体産生細胞のみを集めることが出来る。この操作により PSC-A に対する抗体産生細胞をきわめて高率に含有する細胞集団を得ることが可能である。さらに、本発明のモノクローナル抗体を持続産生するクローンのみを得るには上述の PSC-A に対する抗体産生細胞を高率に含有する細胞集団を適宜に希釈して収容培地中で培養し生じた単一細胞の集団であるコロニーを採取して培養することにより達成できる。

かくして得られる本発明のモノクローナル抗体産生クローンから得られる抗体のグロブリンクラスの同定は前述のヒト B リンパ系細胞の細胞融合の項で示したと同一方法により実施可能である。また該抗体産生クローンを要すれば公知の保存用処置を施すことにより凍結保存可能である。

さらに、本発明のモノクローナル抗体は市販の牛胎児血清添加培地あるいは無血清培地に適宜のスケールで該抗体産生クローンを培養し、その培養液を遠心分離により採取することにより製造することが出来る。

培養液からの本発明のモノクローナル抗体の精製は、細胞融合の項に示したと同じ諸種の手法を組み合わせて用いることで実施可能である。

以上のように各種の製造法によつて得られる本発明のモノクローナル抗体はいずれも緑膿菌の各種血清型菌に共通に反応するという特長すべき性質を生かすことにより以下の述べる用途に供することが出来る。

まず、本発明のモノクローナル抗体の緑膿菌感染症の診断用試薬への用途について説明する。

本発明者らは本発明のモノクローナル抗体が前述の実施例 1 に示すように緑膿菌の A ~ M 型の各種血清型菌に共通に反応するが他の細菌類には反応しないという特性を有するため、該抗体が細菌感染症例あるいはその疑いのある患者のそれぞれ

検査材料につき緑膿菌感染の有無を迅速かつ適確に診断する上できわめて有用な診断用試薬になり得ることを見出ししている。

本発明のモノクローナル抗体を組み込んだ緑膿菌感染症の診断用薬としてはこの種の診断には鋭敏な感度や精度とともに簡便さや高い経済性が要求されるところから少量の患者由来の検査材料で容易に診断出来る蛍光抗体法や EIA 法に基づくものが好適である。

例えば蛍光抗体法に基づく本発明の診断薬の場合は、本発明のモノクローナル抗体にフルオレクセンイソチオシアネート（以下 FITC という）等の蛍光色素を直接結合させた直接法試薬あるいは本発明のモノクローナル抗体といわゆる第 2 抗体に相当する異種動物由来の本発明のモノクローナル抗体に対する抗体に FITC を結合させたものからなる間接法試薬が適用し得る。同様に EIA 法ではたとえばパーオキシダーゼで標識された本発明のモノクローナル抗体とパーオキシダーゼの発色用基質であるクロムナフトールとの組み合わせか

らなる直接法試薬あるいは本発明のモノクローナル抗体、パーオキシダーゼ標識第2抗体およびコロナフトールからなる間接法試薬をそれぞれ用いることが出来る。

これらの診断用試薬は、メンブランフィルターやスライドガラス上に塗布し固定した患者由来の少量の検査材料たとえば血液、尿、喀痰、分泌液、糞便など、要すればそれらの培養物に直接適用して反応させ、螢光顕微鏡、光学顕微鏡、自動測定装置あるいは肉眼観察により迅速かつ簡便に診断することが可能である。

かくして緑膿菌による感染と診断された場合は患者を早期治療に持ち込めるという利点を強調することが出来る。

なお、本発明のモノクローナル抗体を緑膿菌感染症の診断用試薬として用いるにあたっては、本発明のモノクローナル抗体は精製品に限定するものではなく、本発明によつて作成された抗体産生細胞の培養液上清あるいは該細胞を移植したマウスから得られる腹水も適宜使用することが出来る。

型で投与するか、あるいは2剤を異なる投与ルートおよび投与時期に用いても併用効果を期待出来る。さらには人工的に調製可能なリン脂質、コレステロール等から構成されるリポソーム中に該抗生物質を封入し、本発明のモノクローナル抗体を該リポソーム膜の外表部分に固着させたいわゆるミサイル療法タイプの製剤でも適用可能である。

なお、本発明のモノクローナル抗体の用量、投与経路は適宜選択されるが用量は体重 μ あたり0.05ないし5 μ が好ましく投与経路は皮内、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内投与が可能である。

また、本発明のモノクローナル抗体はマウスに対する急性毒性がもとより極めて低いことから動物およびヒトの緑膿菌感染に対して高度免疫グロブリン製剤として受動免疫療法に好適なものと言える。

以下に本発明のモノクローナル抗体に関する実施例と試験例を例示する。

実施例2 マウスハイブリドーマによる本発明のモノクローナル抗体の製造

つぎに本発明のモノクローナル抗体の緑膿菌感染症の予防治療剤への用途について述べる。

本発明者らは本発明のモノクローナル抗体を適宜選んでその感染予防ならびに治療効果を緑膿菌感染マウスを用いて検討したところ、比較的少量の投与量で本発明のモノクローナル抗体が血清型の異なる緑膿菌の感染に対しては一定の感染予防および治療効果を示すことを見い出している。

すなわち、本発明のモノクローナル抗体を緑膿菌感染症の予防治療剤として用いる場合は注射剤の形で用いるのが好ましく、単独あるいは通常用いられる添加剤、賦型剤を加えて液剤あるいは同時溶解型の凍結乾燥製剤として用いることが出来る。実際の感染予防治療にあたっては本発明のモノクローナル抗体2種以上混合して用いてもよく、また本発明のモノクローナル抗体を抗緑膿菌活性を有する抗生物質と併用することによつても強い感染予防治療効果を発現させることが出来る。特に後者の該抗生物質と併用する場合は本発明のモノクローナル抗体を該抗生物質と混合した製剤の

実施例1に記載した方法により得たPSC-Aの生理食塩液溶解液とフロイントの不完全アジュバント(ヤトロソ社)を等量混ぜ連結注射針を用いて油中水型のエマルジョンを作成し免疫用抗原とした。

生後8週令のBALB/C雌性マウスに上記のPSC-Aのエマルジョンを1週間間隔で通算3回免疫した(1回あたりPSC-A免疫量10 μ g/マウス腹腔内投与)。最終免疫の4日後にマウスの頸部切断にて放血後脾臓を摘出し単細胞分散を行ない細胞融合用の脾細胞とした。

細胞融合用のパートナー細胞には10%牛胎児血清加ダルベッコMEM培地であらかじめ培養(ナブコ製CO₂インキュベーター、37℃、5%CO₂/相対湿度100%)して増殖させたNS-1マウスミエロマ細胞を用いた。

上記の脾細胞5 \times 10⁶個とNS-1細胞5 \times 10⁷個とを混合し、これに50%ポリエチレングリコール(M.W.=1000-6000平井化学)を含有する細胞融合用培地を用いて常法により細胞融合

を行なつた。

融合細胞は10%牛胎児血清加ダルベッコMEM培地で細胞浮遊液とし96ウエルのプラスチック平底マルチプレート(ファルコン社)にミエローマ細胞換算で $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 個/ウエル/0.1mlになるよう分注し培養した。この際フィーダ細胞として正常BALB/Oマウスの脾細胞浮遊液を加え $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 個/ウエル共存させた。

翌日よりHATを含有する10%牛胎児血清加ダルベッコMEM培地で培養液を半量ずつ置換していわゆるHATセクションを約2週間にわたつて行ない、ハイブリドーマの増殖が認められたウエルの上清を採取してDIBA法によりPSC-Aおよび緑膿菌IID 1130株に対する抗体産生の有無をスクリーニングした。

DIBA法は96ウエルのU底マルチプレート(ファルコン社)を用い、1ドット当り0.1μgのPSC-Aを抗原として固定した3.1mm角のメンブランフィルター(ミリポアー47mm径格子入フィルターHAWG047)にまた緑膿菌IID 1130株

られた場合は抗体産生能の測定と顕微鏡観察を行ないモノクローナルであることを確認した上さらに再度同じ操作を繰返し、抗体持続産生能の高い抗PSC-Aモノクローナル抗体産生クローンを得た。得られた各クローンは培養スケール徐々に上げ最終的に500mlの10%牛胎児血清加ダルベッコMEM培地で培養(スターリングシステム、日本インターメッド)しその培養上清につき抗体の性質を調べた。

以上の実験操作を前後2回にわたつて行ない、最終的に第3表に示す本発明のモノクローナル抗体産生クローンを7株得た。

7株のハイブリドーマクローンの産生する本発明のモノクローナル抗体のグロブリンクラスはパーオキシダーゼで標識したヤギ抗マウスIgG抗体およびヤギ抗マウスIgM抗体(カッペル)を用いたDIBA法およびセファクリールS300(ファルマシア)のゲル透過法により測定したところ、5株がIgG、2株がIgMであつた(第3表参照)。

は実施例1と同様のものにハイブリドーマの培養上清100μlを加え室温に30分、ついで上清除去後パーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGノグロブリン抗体(DAKO社)の1000倍希釈液100μlを加えて同様に30分それぞれ反応させて最後に基質としてクロロナフトールを加えて発色させた。抗原を固定したメンブランフィルター上に肉眼的に発色を認めたものを抗体産生陽性と判定した。

このスクリーニングの結果、抗体産生陽性のウエルのハイブリドーマはさらに限界希釈法によりクローニングを行なつた。

すなわち、該抗体産生陽性のハイブリドーマのHAT含有培地による浮遊液を調製し細胞濃度測定して新しいマイクロプレートに最大希釈でハイブリドーマが0.5個前後/ウエルになるようハイブリドーマの10倍および2倍希釈系列を分して培養した。この時各ウエルには正常マウス脾細胞を 10^5 個/ウエル共存させた。

高希釈のウエルでハイブリドーマの増殖が認め

また、第3表に示すように本発明のモノクローナル抗体はPSC-Ab-M7を除きA~M型の緑膿菌菌体との明瞭な反応が認められたが緑膿菌以外の細菌12株とはほとんど反応しなかつた。

第3表

ハイブリドーマ クローンNo	本発明のモノク ロナル抗体	グロブリン クラス	A~M型 緑膿菌との 反応性※1	他の細菌 との反応 性※2
1	PSC-Ab-M1	IgG	+	—
2	PSC-Ab-M2	IgG	+	—
3	PSC-Ab-M3	IgG	+	—
4	PSC-Ab-M4	IgM	+	—
5	PSC-Ab-M5	IgG	+	—
6	PSC-Ab-M6	IgG	+	—
7	PSC-Ab-M7	IgM	± ~ +	—

※1: 第2表の血清型A~M型の緑膿菌IID株との反応性をDIBA法により測定した。本発明のモノクローナル抗体PSC-Ab-M7のみ反応性が弱かつた。

※2: 第2表の緑膿菌(シュードモナス・アエルギノサ)以外の細菌との反応性をDIBA法により測定した。本発明のモノクローナル抗体はいずれも陰性であつた。

さらに、第3表の本発明のモノクローナル抗体のうち、PSC-Ab-M2 (IgG)、PSC-Ab-M4 (IgM) および PSC-Ab-M6 (IgG) をそれぞれ産生するハイブリドマクローン株2、4および6株につき10%牛胎児血清加ダルベッコMEM培地で培養して増殖した細胞をブリストン(アルドリッチ) 0.5 ml/マウスを投与して前処置したBALB/Cマウスの腹腔内に 1×10^7 個ずつ接種して2-3週間後に得られた腹水から本発明のモノクローナル抗体を精製した。

ハイブリドマクローン株2および株6の腹水はそれぞれ下記の如くプロテインA固定化アフィニティカラムによる方法でそれぞれ精製した。すなわち、マウス腹水を1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)で中和後腹水と同量の0.2M リン酸緩衝液(pH 8.0)を加え1ミクロンのガラスフィルターを通過させたのちプロテインA-セファロース(ファルマシア)のアフィニティカラムに付し0.2M リン酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄した。ついで50 mM NaClを含む0.1M クエン酸緩衝液

(pH 5.5)で溶出させた。

溶出液は上記のTris-HCl緩衝液で中和後冷却し50%飽和硫酸で塩析して沈澱を集め、これを0.05%アジ化ナトリウムを含むダルベッコPBS(-)(pH 7.4)(日水製薬)に溶解し、精製抗体の保存液とした。

この精製抗体の保存液は、用時ダルベッコPBS(-)あるいは生理食塩液に透析して硫酸とアジ化ナトリウムを除き実験に供した。また、ハイブリドマクローン株4の腹水は下記の方法で精製した。

マウス腹水に等容のPBS(-)を加えついで硫酸を加えて30%飽和硫酸濃度とし、これを遠心分離して得られる上清にさらに硫酸を加え50%飽和硫酸濃度とした。

得られた沈澱をPBS(-)に溶解し、これにTris-HCl緩衝液を加えてpH 8.0に調整した。ついでセファクリルS300(ファルマシア)によるゲル透過に付しPBS(-)で溶出させ1gM画分を回収した。

1gM画分は5 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0

)に対して透析を行ない生成した沈澱を集めさらに0.2M Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)に溶解して0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS(-)に対して透析した。得られた溶液を精製抗体の保存液とした。該保存液は用時PBS(-)に透析してアジ化ナトリウムを除いて実験に供した。

以上の方法によつて精製された3種類の本発明のモノクローナル抗体の収量および抗体価は第4表の通りであつた。

第4表

ハイブリドマ 株	本発明のモノク ローナル抗体	クロアリンガラス	マウス腹水 処理量	得られた精製 抗体量 ※1	抗体価 ※2
2	PSC-Ab-M2	IgG	100ml	188mg	2.56×10^5
4	PSC-Ab-M4	IgM	88ml	132mg	1.28×10^5
6	PSC-Ab-M6	IgG	130ml	203mg	5.12×10^5

※1:牛血清アルブミン標準液(第1化学薬品)を標準にしてローリー法により精製抗体保存液をPBSマイナスイオンで透析置換したものにつき濃度を測定して積算した。

※2:抗原としてシュードモナス・アエリギノサ IID1130株(E型)の0.3%ホルマリン処理菌体を抗原(抗原量1ドット当り0.4μg)とし、1mg/ml濃度の精製抗体液がDIBA法で陽性反応を示す最大希釈倍数で示した。

実施例3 ヒトマウスハイブリドーマによるヒト由来の本発明のモノクローナル抗体の製造

DIBA法による緑膿菌 IID 1130 株 (E 型) に対する血清中抗体価が 1.28×10^4 倍の健康人より得たヘパリン加末梢血よりファイコール・コンレイ比重遠心法により単核細胞のバンド部分を採取しこれを抗体産生能をもつヒト B リンパ系細胞浮遊液として細胞融合に用いた。

細胞融合を行なうに先立つてこのヒト B リンパ系細胞 (1×10^7 個/ ml ・10%牛胎児血清加 RPMI 1640 培地) に実施例1で得た PSO-A ($20 \mu g/ml$) 1 ml を加えて混合し 48 時間培養した (ナブコ CO₂ インキュベーター: 37℃、5% CO₂/相対湿度 100%)。その後遠心分離により培地で細胞を洗浄し細胞液合に供した。

細胞融合は PSO-A で *in vitro* 感作を行なった上記ヒト B リンパ系細胞と HAT 培地感受性の NS-1 マウスミエローマ細胞 5×10^6 個を混ぜ実施例2と同様の条件で行なった。

ンを1株得た。

第5表に示すように該抗体産生クローンより得られる本発明のモノクローナル抗体は A~M 型の緑膿菌菌体といずれも共通に反応したが、緑膿菌以外の細菌12株とはほとんど反応しなかった。

また、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体および同 IgM 抗体 (カッペル社) を用いた DIBA 法およびゲル尹過法により本発明のモノクローナル抗体のグロブリンクラスは IgG と判定された。しかしながら、該ハイブリドーマクローンの培養液中における産生抗体濃度は実施例2のマウスハイブリドーマクローンに比べ低かった。

第 5 表

ハイブリド マクロー ナル	本発明のモノク ローナル抗体	グロブリン クラス	A~M型 緑膿菌と の反応性※1	他の細菌 との反応 性※2
I	PSO-Ab-HM1	IgG	+	-

※1: 実施例2と同様に血清型 A~M 型の緑膿菌 IID 株との反応性を DIBA 法により測定した。但し第2抗体にはパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体 (カッペル社) を用いた。

得られたハイブリドーマは実施例2と同様に正常マウス脾細胞をフィーダー細胞として共存させ 96 ウェルのプラスチック平底マイクロプレート (ファルコン) 中で HAT セレクションを行なった。

ハイブリドーマの増殖が認められたウェルの培養上清につき、DIBA 法によりパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体 (カッペル) を用いて PSO-A および緑膿菌 IID 1130 株に対する抗体産生の有無をスクリーニングした。

抗体産生が認められたウェルのハイブリドーマを実施例2と同様に限界希釈法にてクローニングした。この操作によりモノクローンであることが確認されたハイブリドーマは培養スケールを徐々に上げ、最終的に 250 ml の 10% 牛胎児血清加ダルベッコ MEM 培地で培養 (スターリングシステム、日本インターメッド) したときの培養上清について産生抗体の性質を調べた。以上の実験操作を前後3回にわたって行ない、最終的に増殖性の良好な本発明のモノクローナル抗体産生クロー

※2: 実施例2と同様に測定した。但し第2抗体は上記と同じものを用いた。

実施例4 EB ウイルス形質転換法によるヒト由来の本発明のモノクローナル抗体の製造

EB ウイルスを産生放出している B95-8 細胞を RPMI 1640 培地に 20% 牛胎児血清 (以下 FCS という) を加えた培地で培養 (ナブコ CO₂ インキュベーター: 37℃、5% CO₂/相対湿度 100%) し、培養上清を分離して EB ウイルス源とした。このウイルス源の感染価は 10^5 TD₅₀/ ml であった。

一方、DIBA 法による緑膿菌 ATCC10145 株 (O 型) に対する血清中抗体価が 6.4×10^3 倍の健康人より得たヘパリン加末梢血よりファイコール・コンレイ比重遠心法により単核細胞のバンド部分を採取しこれを抗体産生能を持つヒト B リンパ系細胞として 20% FCS 加 RPMI 1640 培地に浮遊 (1×10^7 細胞/ ml) をさせて用いた。該ヒト B リンパ系細胞浮遊液 1 ml に実施例1で得た PSO-A を同じ培地に溶解したもの 1 ml ($20 \mu g$

／ ml)を加え37℃48時間培養(ナブコCO₂インキュベーター内)して抗原による *in vitro* 感作を行なつた。

ついで上記のEBウイルス液0.5 ml を加えて接触感染させ、フィーダー細胞としてマイトマイシンで不活化した健康人末梢血由来白血球を加えプラスチックマルチプレート(ファルコン)に0.02 ml ずつ分注し37℃2週間培養した。その後細胞増殖がみられたものを継代培養に移し3代継代したところで培養上清のPSC-Aおよび緑膿菌ATCC 10145株に対する抗体産生の有無を実施例3と同様にDIBA法によりスクリーニングした。

該抗体産生が認められた培養物についてはさらに継代して細胞増殖させ得られた細胞をRPMI 1640培地(FCS不含)に浮遊(10⁶個／ ml)させた。該細胞浮遊液5～10 ml にあらかじめクロミウムクロライド法により調製したPSC-A感作ヒツジ赤血球浮遊液(10⁶個／ ml)1 ml を加え1晩4℃に静置してロゼットを形成させ、さら

にこれをファイコール・コンレイの密度勾配遠心法によりロゼット形成細胞を集めた。

ロゼット形成細胞は低濃度の塩化アンモニウム溶液中に短時間(1～2分間)浮遊させた後、約10倍量のRPMI 1640培地を加えて遠心分離を行ないさらに同培地で遠心洗浄してヒツジ赤血球をほとんど含まない細胞を集めた。得られた細胞は20% FCS加RPMI 1640培地で継代培養を5回繰返し、その培養上清について再度DIBA法によりPSC-Aに対する抗体濃度を測定した。培養上清に高い抗体濃度が認められた細胞集団については単細胞分散させ快寒天培地に加えてプラスチックシャーレに注入し37℃2～3週間培養した。かくして培地上に形成されたコロニーを20% FCS加RPMI 1640培地に浮遊させて継代培養を行ない、抗PSC-Aモノクローナル抗体すなわち本発明のモノクローナル抗体の産生クローンを得た。

以上の実験操作を通算3回行ない、比較的増殖性のよい本発明のモノクローナル抗体産生クロー

ン2株を得た。

本発明のモノクローナル抗体産生クローンは20% FCS加RPMI 1640培地で培養後10% FCS加RPMI 1640培地に馴化させて最終的に500 ml の同培地で培養(スターリングシステム、日本インターメッド)し、その培養上清について本発明のモノクローナル抗体の性質を調べた。結果は第6表に示す通りで、グロブリンクラスはIgGとIgMであつた。また、その他の性質は実施例3および4に記載のものと類似していた。

第 6 表

抗体産生 クローン №	本発明のモノ クローナル 抗体	グロブリン クラス	A～M型 緑膿菌との 反応性 ※1	他の細菌 との反応 性 ※2
A	PSC-Ab-H1	IgG	+	—
B	PSC-Ab-H2	IgM	+	—

※1, ※2: 実施例3に記載の方法と同じ。

さらに、本発明のモノクローナル抗体PSC-H1を産生する抗体産生クローン№A株については無血清培地(HB101™培地、富士レビオ)への馴

化を行ない、馴化した該クローンを最終的に約5ℓスケールでのスターリングシステム(日本インターメッド)を用いて37℃CO₂インキュベーター内で培養し、その培養上清から本発明のモノクローナル抗体を精製した。精製法は実施例1および2に記載のプロテインA-セファロースのアフィニティカラムを用いた方法に準拠して行なつた。

得られた精製抗体の収量および抗体価は第7表に示す通りであつた。

第 7 表

抗体産生 クローン №	本発明のモノ クローナル 抗体	培養上清 処理量	得られた 精製抗体 量 ※1	抗体価 ※2
A	PSC-Ab-H1	約4.7ℓ	15.6g	1.28×10 ⁵

※1, ※2: 実施例2の第4表の方法に同じ。

実施例5 本発明のモノクローナル抗体を用いた
緑膿菌感染症の診断用試薬(その1)

(1) 蛍光抗体直接法試薬

実施例2で得た本発明のモノクローナル抗体PSC-Ab-M2精製保存液を0.9%食塩水に対して

十分透析後蛋白濃度を 10 mg/ml に調整した。この 1 ml の抗体溶液に 0.1 ml の 0.1 M 炭酸緩衝液 ($\text{pH } 9.0$) を加え 4°C に冷却後 1 mg/ml 濃度となるように同緩衝液に溶解したフルオレッセンイソチオシアネートアイソマー 1 (シグマ) 溶液 0.1 ml を攪拌滴下した。

室温で 1 時間ゆつくり攪拌した後直径 1 cm 長さ 12 cm のセファデックス G-50 (ファルマシア) カラムに添加し 0.05% アジ化ナトリウムを含むダルベッコ PBS (-) (日水製薬) 溶液にて溶出した。

蛍光ラベルされた抗体を含む画分を集め 4°C に保存した。以上の操作で得られた蛍光抗体のフルオレッセンイソチオシアネート (以下 FITC) / 抗体のモル比は 2.57 であった。

上記の蛍光抗体を組み込んだ下記の 2 種類の溶液からなる緑膿菌診断用の試薬キットを作製した。

溶液 1. 蛍光抗体液: FITC 標識 PSC-A-Ab-M2

(上記の方法で得た蛍光抗体液) 1 ml

溶液 2. 洗浄液: 生理食塩液 500 ml

シダーゼ (シグマ Type VI) の同緩衝液溶解液 (10 mg/ml) 1 ml を加え混合しついでスターラーで攪拌しながら 1% グルタルアルデヒド (和光純薬) 溶液を 0.1 ml 徐々に滴下しさらに室温で 2 時間攪拌を続けた。

その後、この溶液を生理食塩液に対して 4°C で 1 夜透析し、透析内液を 4°C で 20000 rpm 30 分間遠心分離し上清を採取した。かくして得られたパーオキシダーゼ標識抗体を 4°C に保存した。

上記の操作で得たパーオキシダーゼ標識抗体を組み込んだ下記の 6 種類の溶液と反応用フィルターからなる緑膿菌診断用の試薬キットを作製した。

溶液 1. 酵素標識抗体液: パーオキシダーゼ標識 PSC-Ab-M6 (上記の方法で得た酵素標識抗体液) 2 ml

溶液 2. 洗浄液: 200 mM NaOH 含有 50 mM Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) 100 ml

溶液 3. 反応防御液: A 液 馬血清 1.5 ml
B 液 0.025% アジ化ナト

(2) 蛍光抗体間接法試薬

実施例 3 で得たハイブリドーマクローン #1 を無血清培地 (HB101TM 培地、富士レビオ) で培養し細胞増殖が静止期になった時に得られた培養上清の PSC-Ab-H1 を用い下記の 3 種類の溶液からなる緑膿菌診断用の試薬キットを作製した。

溶液 1. 第 1 抗体液: 上記で得られた培養上清 (PSC-Ab-H1) の原液 1 ml

溶液 2. 第 2 抗体液: FITC 標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリン抗体 (カッベル社) の PBS (-) による 100 倍希釈液 1 ml

溶液 3. 洗浄液: 生理食塩液 500 ml

実施例 6 本発明のモノクローナル抗体を用いた緑膿菌感染症の診断用試薬 (その 2)

(1) 酵素抗体直接法試薬

実施例 2 で得た本発明のモノクローナル抗体 PSC-Ab-M6 の精製保存液を 0.05 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) に対して十分に透析後蛋白濃度を 10 mg/ml に調整した。

この抗体溶液 1 ml にホースラデッシュペーパーオキ

リウムを含む上記洗浄液 10 ml

(A 液 1 ml と B 液 9 ml を用時混合する)

溶液 4. 酵素反応基質液: I 液 3 mg の 4-クロロ-1-ナフトールの 1 ml メタノール溶解液
II 液 1% 過酸化水素 1 ml
(I 液 1 ml と II 液 $60 \mu\text{l}$ および上記洗浄液 5 ml を用時混合する)

反応用フィルター: ミリポア-47 mm 径格子入フィルター (HAWG 047) 2 枚

(2) 酵素抗体間接法試薬

実施例 2 で得た本発明のモノクローナル抗体 PSC-Ab-M4 の精製保存液を PBS (-) に対して十分透析して抗体液とし下記の種類の溶液と反応用フィルターからなる診断用の試薬キットを作製した。

溶液 1. 第 1 抗体液: PSC-Ab-M4 の PBS (-) 溶液 2 ml

溶液 2. 第 2 抗体液: パーオキシダーゼ標識ウサ

ギ抗マウスイムノグロブリン抗体 (DAKO

) の PBS (-) に よる 100 倍希釈液 1 ml

溶液 3. 洗浄液: 上記(1)の直接法試薬に同じ。

溶液 4. 反応防御液: A 液、B 液いずれも(1)の直接法試薬と同じ。

溶液 5. 酵素反応基質液: I 液、II 液いずれも(1)の直接法試薬と同じ。

反応用フィルター: ミリポア 47 mm 径格子入りフィルター (HAWG 047) 2 枚

実施例 7 本発明のモノクローナル抗体を用いた緑膿菌感染症の予防治療剤

(1) 液剤

実施例 1 で得た本発明のモノクローナル抗体 C-Ab、実施例 2 で得た同 PSC-Ab-M2、PSC-Ab-M4、PSC-Ab-M6 および実施例 4 で得た PSC-Ab-H1 のそれぞれ精製保存液をそのままあるいは濃縮してダルベッコ PBS (-) (日本製薬) に対して透析後さらに該抗体の蛋白濃度を 1 mg/ml になるように PBS (-) を加えて調整した。

該抗体溶液をニュクリポアー N020 (ヌクリポ

アー社) を用いてそれぞれ個別に無菌濾過した。

得られた濾液を 1 ml ずつバイアル瓶に無菌的に分注して本発明のモノクローナル抗体の液剤を得た。

(2) 凍結乾燥製剤

実施例 2 で得た本発明のモノクローナル抗体 PSC-Ab-M6 の精製保存液を注射用蒸留水に対して透析後蛋白濃度を 1 mg/ml に調整した。これにマンニトールを 50 mg/ml 濃度に溶解しニュクリポアー N020 を用いて無菌濾過した。

得られた濾液を 1 ml ずつ無菌的にバイアル瓶に分注した後凍結乾燥して凍結乾燥製剤を得た。

(3) 抗生物質との混合製剤

実施例 2 で得た本発明のモノクローナル抗体 PSC-Ab-M6 の上記(2)の注射用蒸留水溶解液 (蛋白濃度 400 μ g/ml) とゲンタマイシンの注射用蒸留水溶解液 (濃度 12 mg/ml) との等容混合液にマンニトールを 50 mg/ml 濃度に溶解しニュクリポアー N020 を用いて無菌濾過した。

得られた濾液を 2 ml ずつ無菌的にバイアル瓶に

分注した後凍結乾燥して混合製剤を得た。

試験例 1 本発明のモノクローナル抗体による緑膿菌の診断同定 (その 1)

トリプトソーヤ寒天平板培地 (日本製薬) に接種し 37℃ 16 時間培養して増殖した第 1 表の A ~ M 型のシュードモナス・アエルギノーサ IID 全株と ATCC10145 株 (G 型)、エスセリヒア・コリ K12 株、バチラス・ズブチリス ATCC6633 株、シュードモナス・ブチダ IFO12996 株、クレブジエラ・ニューモニアエ ATCC10031 株およびセラシア・マーセッセンシ IID620 株の各集落を生理食塩液に懸濁させ波長 540 nm の吸光度が 0.2 前後になる様に菌液を調製した。

50 μ l の各菌液と実施例 5 の(1)蛍光抗体直接法試薬で作製した試薬キットの溶液 1 の蛍光抗体液 50 μ l を小試験管内で混合し室温で 1 時間反応後各菌液を 2 ml の生理食塩液で合計 3 回遠心洗浄した。少量の蒸留水に懸濁した菌体をスライドグラスに塗布し風乾・封入後無蛍光イマージョンオイル (オリンパス光学) を 1 滴たらし UV 励起

系フィルターを装着した落射蛍光顕微鏡 (オリンパス光学、BH2-RFL 型) を用い蛍光を観察した。

その結果該蛍光抗体液を反応させたシュードモナス・アエルギノーサの全供試菌株にはいずれも菌体表面に強い緑色の蛍光が観察されたが、蛍光抗体液を反応させなかつた菌体には蛍光発色がみられなかつた。また、緑膿菌以外のエスセリヒア・コリ K12、バチラス・ズブチリス ATCC6633、シュードモナス・ブチダ IFO12996、クレブジエラ・ニューモニアエ ATCC10031 の各株では蛍光抗体液と反応させたにもかかわらず菌体表面に蛍光発色がみられなかつた。

なお、実施例 5 の(2)蛍光抗体間接法試薬の試薬キットで行なつた場合も上記と全く同じ結果であつた。

試験例 2 本発明のモノクローナル抗体による緑膿菌の診断同定 (その 2)

細菌菌液は上記試験例 1 で用いた菌株のものをすべて蒸留水で 2 倍希釈して使用した。

実施例6に示した(1)酵素抗体直接法試薬の試薬キットを同定に用いた。まず反応用フィルターを格子サイズ(3.1mm角)に眼科用ハサミで切りとり、各格子に各細菌菌液をマイクロシリンジで0.5μlずつドットし70℃、30分間加熱して固定した。

細菌を固定した各格子は96ウエルのU底マイクロプレート(ファルコン)の各ウエルに入れ、ついで溶液3の反応防御液(A、B混合液)を150μlずつ分注しマイクロプレートを室温で15分間振とう後各ウエル内の液を吸引除去した。つぎに溶液1の酵素標識抗体液100μl/ウエルを加え室温30分間振とうし吸引除去した。その後各ウエルに100μlの溶液2の洗浄液を分注し室温で2-3分間振とう後内容液を吸引除去した。この洗浄液による操作をさらに2回繰返した後各ウエルに酵素反応基質液(I液とII液混合)100μlを分注し室温で15分間振とうし、内容液を吸引除去した。各ウエル内の格子を菌液をドットした側に向け格子上の発色度合を判定した。

治療効果に関する実験は上記予防効果の実験と同様の投与量で緑膿菌感染2時間後に1回のみ腹腔内に投与した。対照群は生理食塩液のみ投与した。感染実験に用いた緑膿菌菌株は第1表に示したPA103(E型)とP28(O型)の2株で、ハートインフュージョン寒天培地(栄研化学)にて一夜培養後集菌し生理食塩液で希釈した後5%ムチンを加えそれぞれマウス一匹あたり1×10⁶CFUを腹腔内へ接種した。

感染後7日間観察を行ない、その生存率から本発明のモノクローナル抗体の50%有効投与量(ED₅₀)の水準を求めた。結果は第8表の通りであった。

その結果、シュードモナス・アエルギノサの全供試菌株をドットした格子上にはいずれも肉眼的に強い発色が認められたが、緑膿菌以外の細菌菌液をドットした格子上には、ほとんど発色がなかった。

なお、実施例6の(2)酵素抗体間接試薬の試薬キットでテストした場合も上記と全く同じ結果であった。

試験例3 本発明のモノクローナル抗体の緑膿菌感染予防治療効果(その1)

実施例7に示したマウス由来の本発明のモノクローナル抗体O-Ab、PSC-Ab-M2、PSC-Ab-M4およびPSC-Ab-M6のそれぞれ液剤を用いてマウスにおける緑膿菌感染の予防および治療効果を検討した。予防効果に関する実験は、生後10週令のBALB/O雌性マウス1群5匹を用い、上記の各本発明のモノクローナル抗体(投与量:蛋白換算で0.1μg~1000μg/マウス)を投与量が1ml/マウスになるよう生理食塩液で適宜希釈して緑膿菌感染の2時間前に1回のみ腹腔内投与した。

第 8 表

	本発明のモノクローナル抗体投与群	感染菌株	※ ED ₅₀ (μg/マウス)
感染予防効果	O-Ab	PA103	100~300
	PSC-Ab-M2		30~100
	PSC-Ab-M4		100~300
	PSC-Ab-M6		3~10
	O-Ab	P28	100~300
	PSC-Ab-M2		30~100
	PSC-Ab-M4		100~300
	PSC-Ab-M6		3~10
感染治療効果	O-Ab	PA103	300~1000
	PSC-Ab-M2		30~100
	PSC-Ab-M4		300~1000
	PSC-Ab-M6		10~30
	O-Ab	P28	300~1000
	PSC-Ab-M2		30~100
	PSC-Ab-M4		300~1000
	PSC-Ab-M6		10~30

※:なお、対照群はいずれの場合も感染後24時間以内に死亡した。

試験例4 本発明のモノクローナル抗体の緑膿菌
感染予防治療効果(その2)

実施例7に示したヒト由来の本発明のモノクローナル抗体PSC-Ab-H1の液剤を用いてマウスにおける緑膿菌感染の予防・治療効果を検討した。

生後12週令のBALB/C雌性マウス1群5匹への抗体の投与量、投与時期、感染緑膿菌の種類および感染菌の接種量は試験例3に示す通りに行なった。

感染後7日間観察によりマウスの生存率からED₅₀値の水準求めた。結果は第9表の通りであった。

第9表

	投与抗体	感染菌株	※ ED ₅₀ (μ g/マウス)
感染効 果	PSC-Ab-H1	PA103	50~100
	"	P28	50~100
感染効 果治 療	"	PA103	50~100
	"	P28	100~300

※：対照群のマウスはすべて感染後24時間以内に死亡した。

3と同様に調製してマウス1匹当たり 1×10^6 CFUを腹腔内接種して感染させた。

感染後7日間観察し、マウス生存数を算定して各投与群の有効水準を求めた。結果は第10表の通りであった。

第10表

試験群	投与量(μ g/マウス)		生存マウス数 試験マウス数
	PSC-Ab-M6	GM	
対 照	—	—	0/10
混合製剤原液	100	3000	10/10
混合製剤10倍希釈液	10	300	8/10
混合製剤100 "	1	30	1/10
PSC-Ab-M6 A群	10	—	1/10
" B群	30	—	6/10
" C群	100	—	10/10
GM I群	—	300	1/10
" II群	—	1200	7/10

試験例5 本発明のモノクローナル抗体と抗生物
質混合剤の緑膿菌治療効果

実施例8に示したマウス由来の本発明のモノクローナル抗体PSC-Ab-M6とゲンタマイシン(以下GM)の混合製剤を用いてマウスにおける感染治療効果を検討した。

マウスは生後10週令のBALB/C雌性マウス1群10匹を用いた。実施例8の混合製剤に1製剤当たり2mlの注射用蒸留水を加えた溶解液(1ml当たりPSC-Ab-M6を200 μ gとGMを6 μ g含有)および生理食塩液による該溶解液10倍希釈液(1ml当たりPSC-Ab-M6を20 μ gとGM600 μ g含有)と100倍希釈液(1ml当たりPSC-Ab-M6を2 μ gとGM60 μ g含有)をそれぞれマウス1匹当たり0.5mlずつ緑膿菌感染の2時間後に1回のみ腹腔内投与した。また比較群としてPSC-Ab-M6のみの10 μ g、30 μ gおよび100 μ g投与群とGMのみ300 μ gと1.2 μ g投与群も設けた。なお、対照群は生理食塩液のみ投与した。

感染緑膿菌はPA103株(E型)を用い試験例

4. 図面の簡単な説明

図面は本発明に用いられる緑膿菌共通抗原PSC-Aの紫外吸収スペクトラムを示す。

特許出願人 三井東圧化学株式会社

